DOI:10.113931/guihaia.gxzw202304039

根肿菌侵染下菘蓝生物碱合成机制

赵淑丽[1]，李国栋[1]，张丽琴[2]，赵明智[3]，施建莲[3]，刘家佳[1*]

（1. 云南中医药大学，昆明 650500；2. 云南省农业科学院园艺作物研究所，昆明 650205；3. 昆明医科大学 海源学院，昆明 650101）

摘　要：为了探究根肿菌胁迫对菘蓝生物碱及其合成关键酶基因表达的影响，该文对根肿菌侵染后 0、7、14、21 d 的菘蓝进行病情形态分级、组织学观察、生理生化指标测定以及转录组学和代谢组学分析。结果表明：（1）接菌后 0、7、14、21 d 菘蓝根部分别发展为 0 级、1 级、3 级、5 级的肿根，且 7 d 是皮层入侵的关键时间点。（2）接种根肿菌 14 d 后，菘蓝叶内可溶性蛋白、丙二醛含量、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、多酚氧化酶和过氧化氢酶活性与同时间对照组比较显著提高，并随着接菌时间的延长呈增加的趋势。（3）代谢组学一共检测到 161 种生物碱，其中吲哚类生物碱数量较多；与未接菌相比，菘蓝接菌后 7、14、21 d 分别存在 16、17、39 种差异代谢物且各组差异代谢物多富集在生物碱和氨基酸代谢通路。（4）转录组测序结果显示：与未接菌相比，菘蓝接菌后 7、14、21 d 分别存在 2 439、256、6 437 个差异表达基因，这 3 组共同富集到 11 个生物碱相关的代谢通路；与未接菌相比，接菌后 7、14、21 d 有 9 个基因（编码 4 种酶 THS、TAT、YUCCA、ALDH）表达量均上升。以上结果揭示了芸薹根肿菌与菘蓝之间的互作机制，探究了根肿菌对吲哚生物碱合成及其关键酶基因的影响，为后期研究菘蓝根肿病抗性基因及生物碱次生代谢途径奠定基础。

关键词：板蓝根，芸薹根肿菌，抗氧化酶，功能基因，吲哚生物碱，代谢组

中图分类号：　　　　　　**文献标识码：**A　　　　　　**文章编号：**

Mechanism of alkaloid synthesis in *Isatis indigotica* infected by *Plasmodiophora brassicae*

ZHAO Shuli[1], LI Guodong[1], ZHANG Liqin[2], ZHAO Mingzhi[3], SHI Jianlian[3], LIU Jiajia[1*]

（1. *Yunnan University of Chinese Medicine*, Kunming 650500, China; 2. *Institute of Horticultural Research, Yunnan Academy of Agricultural Sciences*, Kunming 650205, China; 3. *Haiyuan College, Kunming Medical University*, Kunming 650101, China）

Abstract: To explore expression level of alkaloid and its synthetase gene in *Isatis indigotica* upon *Plasmodiophora brassicae* Woronin exposure. Our study verified grade of disease severity according to morphology. Moreover, histological, physiological, biochemical parameters have been collected together with transcriptomics and metabolomic analysis in *Isatis indigotica* after infection at time scale 0, 7, 14, 21 d. Results showed that: (1) After infect with *P. brassicae*, *I. indigotica* showed club roots grade in 0, 1, 3, and 5 respectively at 7, 14, 21 d, notably, cortical invasion occurred on 7 d. (2) Our study revealed when *P. brassicae* exposes lasting 14 d later, the

收稿日期：

基金项目：云南省应用基础研究项目（202101AU070121）；云南省重大科技专项（202102AE090031）。

第一作者：赵淑丽（1999-），硕士研究生，研究方向为民族药资源保护与开发利用，（E-mail）2764522605@qq.com。

*通信作者：刘家佳，博士，助理研究员，从事药用植物代谢通路研究，（E-mail）441603928@qq.com。

level of soluble protein and malondialdehyde, along with superoxide dismutase, peroxidase, polyphenol oxidase and catalase activity in *I. indigotica* increased significantly compared to control group at time depended manner. (3) A total of 161 alkaloids were detected in metabolomics, among those alkaloids, indoles were noticed as the most abundant form. There were 16, 17 and 39 discriminating metabolites have been spotted after infected with *P. brassicae* at 7, 14, 21 d, the most discriminating metabolites enriched at alkaloid and amino acid metabolism pathways. (4) Transcriptome analysis showed that there were 2 439, 256 and 6 437 genes expression alteration at 7, 14, 21 d compared to control, those differentially expressed genes enriched at 11 alkaloids related metabolism pathways. Markedly, expression level of 9 genes (encoding for enzymes thebaine synthase, tyrosine aminotransferase, indole-3-pyruvate monooxygenase and aldehyde dehydrogenase) were increased after infection at 7, 14, 21 d. Our results revealed the interaction between *P. brassicae* and *I. indigotica*. The effects of *P. brassicae* on indole alkaloids and enzymic genes expression laid ground for studying genes mediate club root resistance and alkaloid secondary metabolic pathways in *I. indigotica*.
Key words: Isatidis Radix，*Plasmodiophora brassicae*，antioxidant enzymes，functional gene，indole alkaloids，metabolome

菘蓝（*Isatis indigotica*），十字花科菘蓝属的二年生植物，全国各地均有栽培，具有很大的经济和药用价值，其干燥根、干燥叶为清热解毒的代表药板蓝根和大青叶（Wong et al., 2022）。菘蓝中的主要生物活性成分生物碱具有抗病毒、抗菌及免疫调节的药理作用，其中吲哚类生物碱的药理活性报道最多，已经证实靛蓝、靛玉红、表告依春、5-羟基吲哚、吲哚-3-甲醛和色胺酮具有抗病毒、抗肿瘤、白细胞抑制及抑菌活性（Sinha et al., 2008；Chen et al., 2021；杨立国等，2021；）。《中国药典》也规定板蓝根和大青叶药材及其制剂质量控制的重要指标分别是表告依春和靛玉红（中国药典，2020）。

十字花科根肿病俗称大根病，其病原为芸薹根肿菌（*Plasmodiophora brassicae*），是一种土传病害，专门寄生在菘蓝等十字花科作物（白菜、油菜、萝卜、芥菜）的根部，通常先侵入根毛，再产生次级游动孢子入侵皮层组织，致使皮层细胞增大，挤压变形，侵染后期细胞内会产生休眠孢子，在此过程中植株根部肿大呈瘤状且生长发育迟缓、凋萎下垂。根肿病侵染也会诱导寄主抗性响应如产生大量的氧自由基，促使膜脂过氧化，破坏细胞膜的结构，而过氧化氢酶（Catalase，CAT）、多酚氧化酶（Polyphenol oxidase，PPO）、超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）和过氧化物酶（Peroxidase，POD）等防御酶主要参与活性氧的消除，维持细胞膜稳定性（Qi et al., 2020；Huang et al., 2022；王公达等，2022）。秦六月（2021）研究表明抗病大白菜 DH40R 中的 CAT、SOD、POD 活性和可溶性蛋白含量在根肿菌侵染 8 d 明显升高，强烈抵抗根肿菌侵染；朱红芳等（2015）研究表明：初期筛选抗肿病的品种时，将可溶性糖、可溶性蛋白和 MDA 作为主要指标；郭珍（2018）研究发现 CAT 与油菜抗病性相关，SOD、POD 与油菜抗病性呈正相关。

目前，对十字花科植物感染根肿菌的相关研究主要还是集中在芸薹属植物，对拟南芥的研究较少，菘蓝感染根肿菌的防御机制以及体内代谢变化的研究几乎没有报道。因此迫切需要探究菘蓝与根肿菌之间的互作机制，以及根肿菌对菘蓝有效成分积累的影响。本研究以接菌后 0、7、14、21 d 的菘蓝为研究对象，采用 Illumina 高通量测序技术和超高效液相色谱-串联质谱技术，通过病情形态分级、组织学观察、生理生化指标测定以及转录代谢分析，拟探讨以下问题：（1）根肿菌侵染菘蓝的动态过程；（2）菘蓝抗根肿病的生理防御机制；（3）根肿菌胁迫对菘蓝生物碱类化合物合成机制的影响。本研究能够为深入挖掘菘蓝抗根肿病功能基因及次生代谢物合成途径等分子研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和菘蓝品种：菌株采自昆明市盘龙区阿子营地区的大白菜发病根瘤，经云南省农业科学院鉴定为 4 号生理小种（Williams 鉴定系统）。实验所需小叶菘蓝种子也由云南省农业科学院园艺作物研究所的十字花科课题组张丽琴老师提供并鉴定。

试剂及仪器：台盼蓝溶液（SIGMA）、甲醛-醋酸-乙醇固定液（50%）；牛血清蛋白、核黄素、愈创木酚、2-硫代巴比妥酸，北京索莱宝科技有限公司；邻苯二酚、三氯乙酸溶液、L-甲硫氨酸，上海麦克林生化科技有限公司；氯化硝基四氮唑蓝（NBT）、乙二胺四乙酸 EDTA，德国 Biofroxx 生物试剂；过氧化氢 30%，云南景锐科技有限公司。其他仪器和耗材包括：Nikon 数码显微镜，血球计数板，烧杯，离心管，容量瓶，量筒，育苗盘，研钵，研棒，比色皿，普析 TU-1810 紫外可见分光光度计，超低温冷冻离心机，光照培养箱，台式鼓风干燥箱，电热恒温水浴锅，千分之一电子天平，托盘天平，冷冻冰箱等。

1.2 试验处理

将冷冻的大白菜发病根瘤置于室温解冻，采用杨佩文等（2002）的方法提取根肿菌休眠孢子，血球计数板测定根肿菌孢子悬浮液的浓度，稀释成 5×10^7 CFU·mL^{-1} 病原菌菌液备用。小叶菘蓝于 72 孔育苗盘中栽培，1 个穴播种 3 颗种子，待其长出 2～3 对真叶后间苗，注射法进行根肿菌（1×10^7 CFU·mL^{-1} 休眠孢子）接种，用 10 mL 注射器吸取菌液，将菌液缓慢注射到实验苗根部，2 ml 菌液/株。分别在接种根肿菌后 0、7、14、21 d 采集正常生长（BLG-CK1、BLG-CK2、BLG-CK3、BLG-CK4）和接种根肿菌（BLG-S1、BLG-S2、BLG-S3、BLG-S4）的小叶菘蓝根部（根及根茎）和叶子（Lan et al., 2019），3 个生物学重复，并液氮冷冻，-80 ℃储存。

1.3 方法

1.3.1 病情形态分级和组织学观察

病情分级参照农业部公益性行业科研专项（201003029）制定的标准（杨华等，2014）。接种根肿菌后每 24 h 根据病情形态分级观察根肿情况并取小叶菘蓝根部进行组织学观察，连续观察 21 d。将小叶菘蓝根部洗干净，取地下 1～2 cm，于 FAA 固定液至少固定 24 h；后将组织从 FAA 固定液取出切成薄片；台盼蓝染液中染色 2 min，染色后用去离子水（ddH_2O）洗去残留的染液，清洗 2～3 次；染上色的根组织薄片放在载玻片上进行显微观察。

1.3.2 生理指标的测定

菘蓝叶片生理指标的测定主要参照高俊凤（2006）和王文龙（2014）的方法，具体如下：（1）硫代巴比妥酸显色法检测 MDA；（2）考马斯亮蓝 G-250 染色法检测可溶性蛋白；（3）愈创木酚比色法检测 POD；（4）氮蓝四唑光还原法检测 SOD；（5）邻苯二酚法检测 PPO（6）紫外分光光度法检测 CAT。

1.3.3 UPLC-MS/MS 测定

1.3.3.1 样品制备

将小叶菘蓝的根及根茎放置于冻干机（Scientz-100F）中真空冷冻干燥后研磨；称取 50 mg 的粉末，加入 70% 甲醇（1.2 mL），每 30 min 涡旋一次（30 s/次，共 6 次）；12 000 rpm，离心 3 min 后，0.22 μm 微孔滤膜将上清过滤在进样瓶中，样品制备完成用于后续实验。

1.3.3.2 色谱质谱条件

ExionLC™ AD 超高效液相色谱（https://sciex.com.cn/），Applied Biosystems 4 500 QTRAP 串联质谱（https://sciex.com.cn/）。液相条件：色谱柱：SB-C18（1.8 μm，2.1 mm * 100 mm，Agilent）；加入了 0.1%甲酸的超纯水（A）与 0.1%甲酸乙腈（B）为流动相，流速：0.35 mL·min^{-1}；洗脱梯度（B 相比例）：0.00 min，5%；9.00 min 内线性增加至 95%，并维持在 95% 1 min；10.00～11.10 min，95%～5%；11.10～14 min，5%；进样量 4 μL；设定柱温为 40 ℃。质谱

条件：电喷雾离子源；电压：+5 500 / -4 500 V；温度：550 ℃；离子源气体 I，气体 II 及气帘气分别设置 50、60 和 25 psi；碰撞诱导电离参数：高。

OPLS-DA 模型中的 VIP 值结合差异倍数值 fold change 来筛选差异代谢物。筛选标准：符合 VIP ≥ 1、fold change ≥ 1.5 和 fold change ≤ 0.67 的代谢物具有显著差异。

1.3.4 RNA 提取与文库构建

RNA 提取与测序由武汉迈维代谢有限公司完成。采用 Illumina 的 NEBNext® UltraTM RNA Library Prep Kit 试剂盒提取 total RNA。琼脂糖凝胶电泳和 Nano Photometer 分光光度计检测 RNA 完整性和纯度。最终达标的样品用于构建小叶菘蓝 cDNA 文库。

1.3.5 转录组测序、分析及注释

利用 Illumina 对小叶菘蓝根及根茎转录组文库进行高通量测序。通过 CASAVA 碱基识别将原始的图像数据转化为原始数据（raw data），经数据评估、过滤除杂及冗余处理等质控获得高质量序列（clean reads），Trinity 组装并层次聚类后得 Unigene。使用 DIAMOND BLASTX 与 HMMER 软件将 Unigene 序列与 Gene Ontology（GO）、Trembl、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）、Swiss-Prot、euKaryotic Ortholog Groups（KOG）、NR、Protein family（Pfam）数据库进行比对，得到基因功能信息。用 DEGSeq R 包鉴定差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），规定同时符合错误发现率（false discovery rate，FDR）＜0.05，$|\log_2$ 差异倍数（fold change，FC）$| \geq 1$ 的基因确定为差异表达的基因并对其进行功能富集分析。

1.3.6 qRT-PCR 分析

植物 RNA 提取同 1.3.4 节。根据转录组数据结果中的 FPKM 值筛选 13 个差异基因，采用 Monad 试剂盒合成 cDNA，以 cDNA 为模板、菘蓝 Actin 基因（Qu et al., 2019）为内参进行 qRT-PCR。利用 Primer-BLAST 设计引物（表 1）、ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 分析。扩增程序：95 ℃，2 min 预变性；95 ℃，5 s 变性；60 ℃，30 s 退火/延伸（40 个循环）；熔解曲线为从 65 ℃ 升至 95 ℃，每升温 0.5 ℃ 采集一次荧光信号。每个样品均设置 3 个重复，使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行实时荧光定量 PCR 结果的计算。将实验结果数据表示为平均值±标准差，并采用 Graphpad 软件对各组数据进行 T 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	正向引物（5′-3′） Forward primer（5′-3′）	反向引物（5′-3′） Reverse primer（5′-3′）
Cluster-16885.9	*GH3*	TTCGCTTCAGGTATGGTCCG	ACCATAGCCACCGAGTTTCG
Cluster-22704.8	*B-ARR*	GTAAGAGGACTCGGATCGGC	CCGTCTCTGCTCTGTTGCAT
Cluster-22719.0	*TGA*	GAGGGTTTCGTCCATCCGAG	GGACTCGTTCACCGCATCAA
Cluster-27535.0	*SAUR*	ACAACAGCAAACAAGGGATCA	GGCAAGGGATCGTGATGGTA
Cluster-28287.0	*AHK*	TCATCTCCAGCAACGCTCAA	CTCTGCACAAACCACTTCCG
Cluster-37953.0	*PP2C*	CCTGACGTGTCCTATCGACG	TTCCATCTCCAACTCCGCAC
Cluster-35278.2	*PP2C*	CGGTCTTTGGGACGTTGTCT	ACGCTTCCTCACACGCTTTA
Cluster-34981.0	*AUX/IAA*	CTCCGGTTCGTTCGTTCAGA	TTCCCTCCCTCTTAGGCTCG
Cluster-37780.0	*PYR/PYL*	TCGGTGATCCTGAAATCGGC	ACCGAGTATGTGTTCGTCGT
Cluster-37916.2	*ABF*	GCTTCGGTTCACCAACATCG	AGAAGAGAGCCGTGGTGAGT
Cluster-36994.3	*THS*	CCGAGGCGTCTAGTTTGGTC	CAGGAGACGATAGAGCCGAC
Cluster-36129.3	*THS*	ATATGGCGGTGACGCTCAG	CGGTTCGCTTCTCCCATATCA
Cluster-24362.0	*THS*	ATTGGATGGAAAGCAGGAGGT	GTGATCTTGCAGACGCATCC
内参基因	*Actin*	GCTCACGGAAGCACCT	CGACCACTAGCGTAAAGT

2 结果与分析

2.1 病情形态分级与组织学观察

根肿菌侵染后植株的病情形态分级和组织学观察结果如图 1 和图 2 所示。接菌后 0 d，根部发育正常无肿瘤，病情指数为 0 级，且组织学观察其细胞排列整齐（图 1：E，图 2：A）；接菌后 7 d 根部开始出现肿大症状，病情指数为 1 级，组织学观察表明皮层细胞明显增大，挤压变形（图 1：F，图 2：C）；接菌后 14 d 主根肿块直径小于茎基部直径的 2 倍，病情指数为 3 级，同时次级游动孢子遍布皮层细胞并开始入侵维管柱（图 1：G，图 2：E）；接菌后 21 d 根部出现较大肿瘤，其直径是茎基部直径的 2~ 3 倍判定病情指数为 5 级，同时次级游动孢子遍布皮层和维管柱（图 1：H，图 2：F）。此结果从表观到细胞层次展示了根肿菌侵染植株的整个发病过程，同时也说明了根肿菌人工接种的可行性。

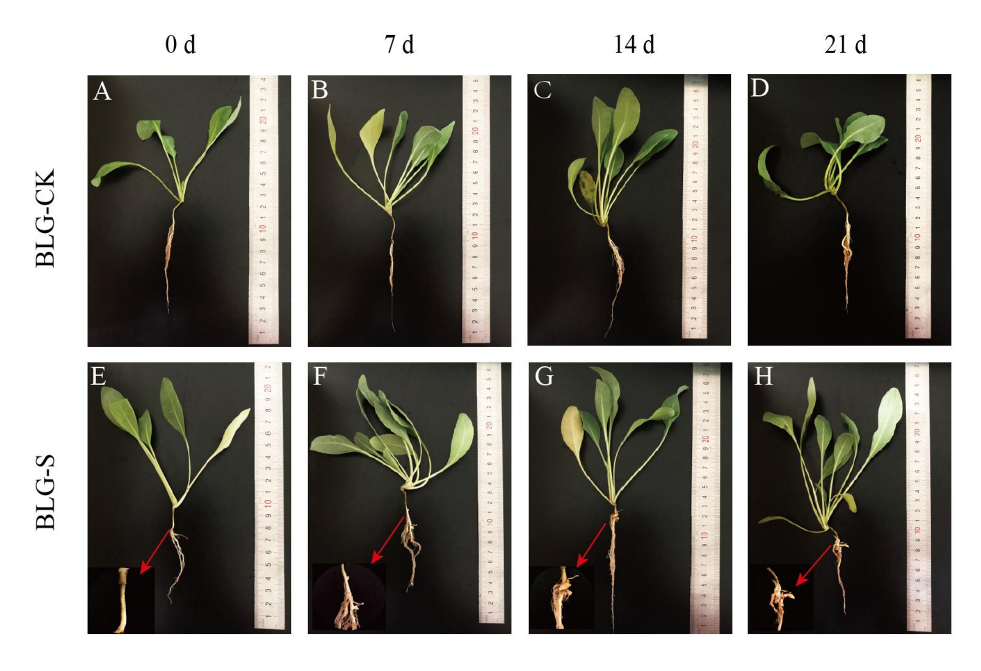
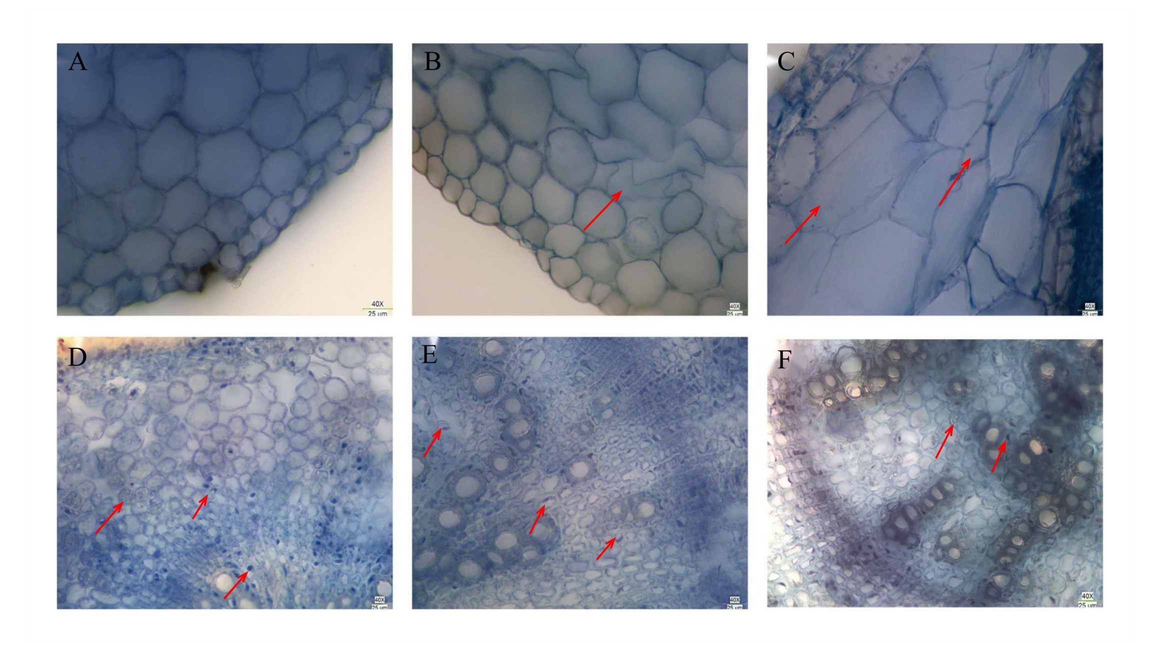


图 1 接菌后 0、7、14、21 d 菘蓝病情形态分级

Fig. 1 Disease morphological classification of *Isatis indigotica* at 0,7,14 and 21 d after inoculation



A. 接菌后 0 d 菘蓝横截面组织学观察；**B**. 接菌后 4 d 菘蓝横截面组织学观察；**C**. 接菌后 7 d 菘蓝横截面组织学观察；**D**. 接菌后 11 d 菘蓝横截面组织学观察；**E**. 接菌后 14 d 菘蓝横截面组织学观察；**F**. 接菌后 21 d 菘蓝横截面组织学观察；箭头指向发病部位。

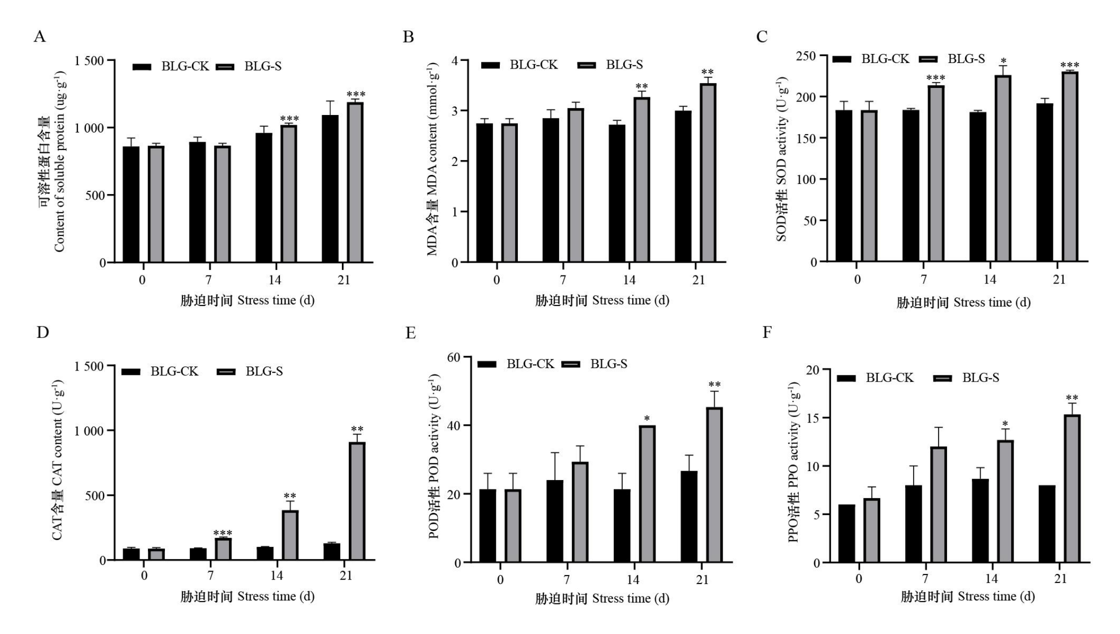
A. Histological observation of cross section of *Isatis indigotica* on 0 d after inoculation; **B**. Histological observation of cross section of *Isatis indigotica* on 4 d after inoculation; **C**. Histological observation of cross section of *Isatis indigotica* on 7 d after inoculation; **D**. Histological observation of cross section of *Isatis indigotica* on 11 d after inoculation; **E**. Histological observation of cross section of *Isatis indigotica* on 14 d after inoculation; **F**. Histological observation of cross section of *Isatis indigotica* on 21 d after inoculation. The arrows pointed to the site of disease.

图 2 根肿菌侵染后菘蓝组织学观察

Fig. 2 Histological observation of *Isatis indigotica* after infection with *Plasmodiophora brassicae*

2.2 生理生化指标测定

由接菌与未接菌处理的生理生化指标变化规律（图 3）可知，接菌处理的可溶性蛋白、MDA 含量和防御酶 SOD、POD、PPO、CAT 活性随接菌时间的延长呈不断上升的趋势；CAT 和 SOD 活性在接菌后 7～21 d，实验组均显著高于相应对照组（$P < 0.05$）；可溶性蛋白、丙二醛含量以及 POD、PPO 活性在接菌后 14～21 d，实验组均显著高于对照组（$P < 0.05$）。以上结果说明菘蓝为抵抗根肿菌侵染自身做出了防御反应。



以$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$ 表示同一时间点实验组与对照组相比差异显著。

$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ manifest that there is a noteworthy discrepancy between the experimental group and the control group at the same time point.

图 3　接种根肿菌后不同时间菘蓝叶生理生化指标测定

Fig. 3　Determination of physiological and biochemical indexes of *Isatis indigotica* at different time after inoculation with *Plasmodiophora brassicae*

2.3 代谢组分析

2.3.1 样品检测及 OPLS-DA 分析

本实验对 7 组样本（BLG-CK1（S1）、BLG-CK2、BLG-CK3、BLG-CK4、BLG-S2、BLG-S3、BLG-S4）进行代谢研究。基于检测平台和自建数据库共检测到 161 种生物碱，其他类生物碱数量最多，占总生物碱的 53%，其次是吲哚类生物碱占总生物碱的 32%（图 4）。OPLS-DA 正交偏最小二乘判别分析（Orthogonal partial least squares-discriminant analysis）结果（图 5）显示各组样品均能得到明显分离，且 BLG-CK3 和 BLG-S3 的分离距离最大，BLG-CK4 和 BLG-S4 次之，这说明接菌 14 d 时根肿菌对菘蓝代谢影响最大。

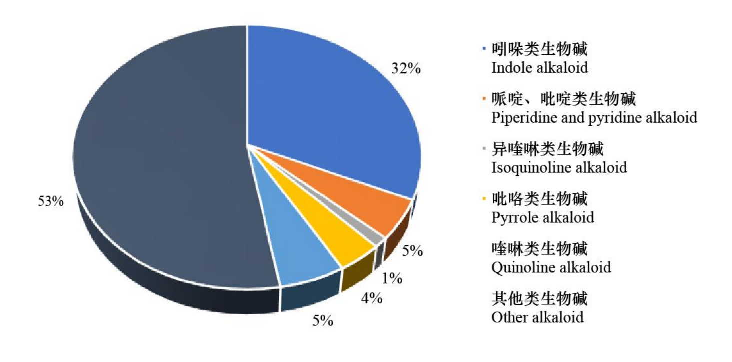


图 4　代谢物类别分析

Fig. 4　Class analysis of metabolites

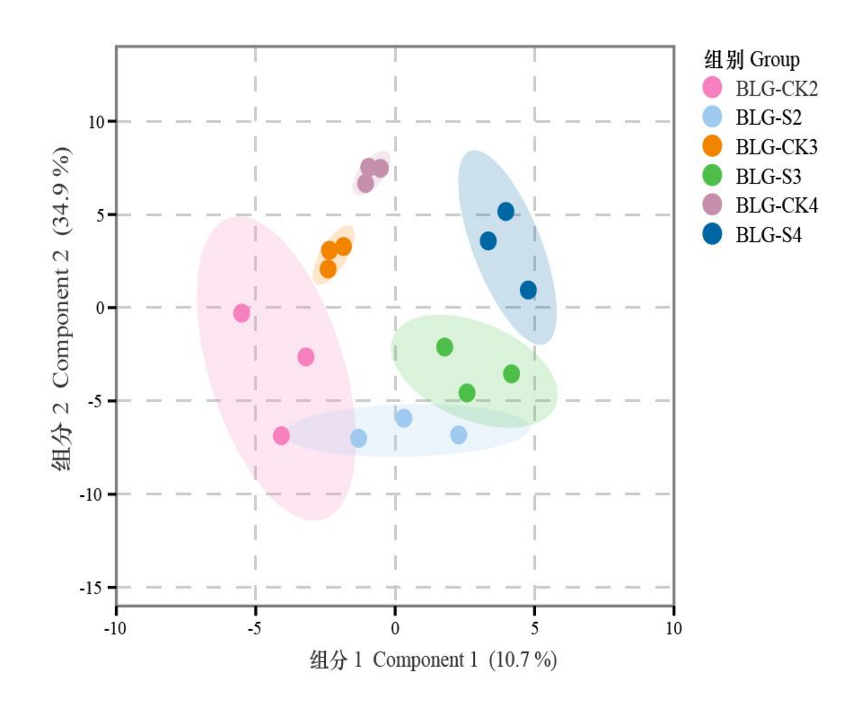


图 5 接种根肿菌后 7、14、21 d 及其相应对照组的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score map at 7,14, 21 d after inoculation with *Plasmodiophora brassicae* and corresponding control group

2.3.2 差异代谢物筛选

进一步对接菌后 7、14、21 d 的菘蓝差异代谢物进行分析，结果发现：BLG-CK2-vs-BLG-S2 有 16 种差异代谢物，6 个上调，10 个下调；BLG-CK3-vs-BLG-S3 有 17 种差异代谢物，9 个上调，8 个下调；BLG-CK4-vs-BLG-S4 有 39 种差异代谢物，32 个上调，7 个下调；BLG-S2-vs-BLG-S3 有 19 个差异代谢物，3 个上调，16 个下调；BG-S2-vs-BLG-S4 有 45 个差异代谢物，19 个上调，26 个下调；BG-S3-vs-BLG-S4 有 34 个差异代谢物，14 个上调，20 个下调（见表 2）。如图 6 所示，将 BLG-CK2-vs-BLG-S2、BLG-CK3-vs-BLG-S3、BLG-CK4-vs-BLG-S4 这 3 组差异代谢物取交集发现共有 5 个差异代谢物，分别为环芸薹宁、Isatindosulfonic acid B、5，6-二羟基吲哚-5-O-β-葡萄糖苷、泛酰巯基乙胺和对香豆酰亚精胺，其中前 3 种为吲哚类生物碱。将 BLG-S2-vs-BLG-S3、BLG-S2-vs-BLG-S4、BLG-S3-vs-BLG-S4 这 3 组差异代谢物取交集发现共有 2 个差异代谢物，分别是吲哚类生物碱 Isatisindigoticanine B 和喹啉类生物碱 2-氧-3，4-二氢-1 H-喹啉-3-羧酸。

表 2 差异代谢物数量统计

Table 2 Differential metabolite count statistics

比对组 Group	总数 Total	上调 Up	下调 Down
BLG-CK2-vs-BLG-S2	16	6	10
BLG-CK3-vs-BLG-S3	17	9	8
BLG-CK4-vs-BLG-S4	39	32	7
BLG-S2-vs-BLG-S3	19	3	16
BLG-S2-vs-BLG-S4	45	19	26
BLG-S3-vs-BLG-S4	34	14	20

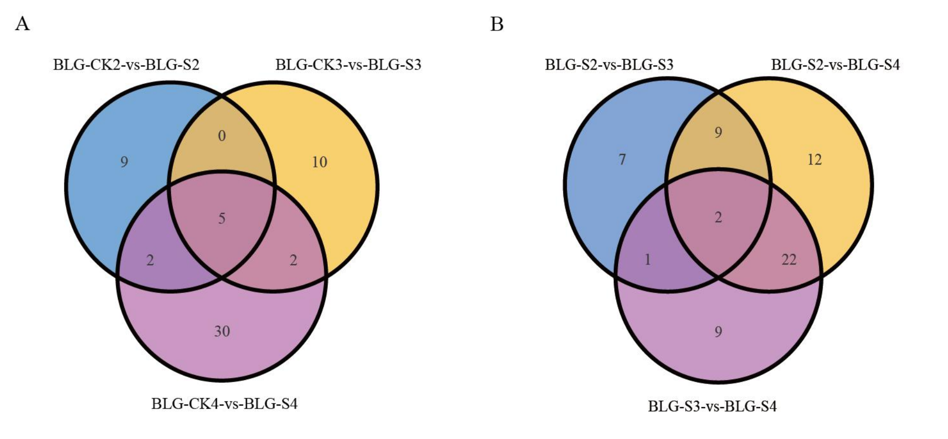


图 6 差异代谢物韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of differential metabolite

2.3.3 差异代谢物 KEGG 富集分析

KEGG 通路富集分析结果见图 7。结果表明，各组别富集在代谢通路（Metabolic pathways，ko001100）上的差异代谢物最多，且生物碱和氨基酸相关的代谢通路变化明显；BLG-CK2-vs-BLG-S2、BLG-CK3-vs-BLG-S3、BLG-CK4-vs-BLG-S4 这 3 组都富集在托烷、哌啶和吡啶生物碱生物合成途径（Tropane，piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis，ko00960）；除了 BLG-CK3-vs-BLG-S3，其他组都在色氨酸代谢途径（Tryptophan metabolism，ko003800）上富集，色氨酸合成途径是吲哚类生物碱合成的前体途径。

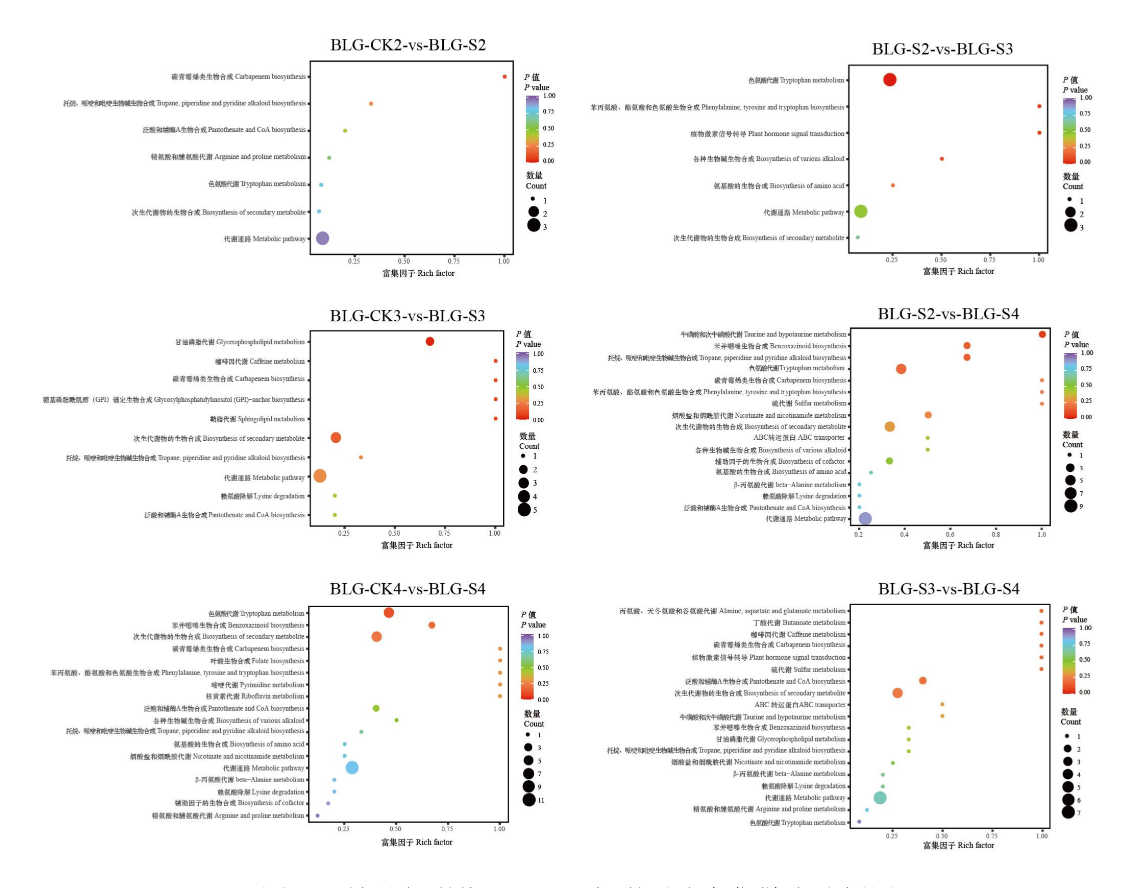


图 7 差异代谢物 KEGG 代谢通路富集散点分析图

Fig. 7 Scatter map of differential metabolites KEGG pathway enrichment

2.4 RNA-Seq 分析

2.4.1 转录组数据组装与质量分析

为了进一步挖掘根肿菌胁迫下菘蓝生物碱积累机制，对菘蓝 21 个样本进行转录组测序和分析得到 1 200 974 786 条 raw reads 和 1 171 808 210 个 clean reads，共获得 175.77 Gb 的有效数据；各样本 Clean Data 均达到 7 Gb，Q20（Qphred 值不低于 20 的碱基数占总碱基数的百分比）碱基百分比均在 97%以上，Q30（Qphred 值不低于 30 的碱基数占总碱基数的百分比）碱基百分比均在92%以上；GC含量（G和C占总碱基数量的百分比）是47.0%~ 47.69%。Trinity 拼接得到 83 775 个 Unigene，平均长度为 1 708 bp，最长达到 16 523 bp，最短是 201 bp，N50 是 2 367 bp。Unigene 长度分布图（图 8）显示，51 799 条（61.83%）Unigene 长度超过 1 000 bp，25 874 条（30.89%）Unigene 长度超过 2 000 bp。以上说明转录组数据质量较高，可进行后续分析。

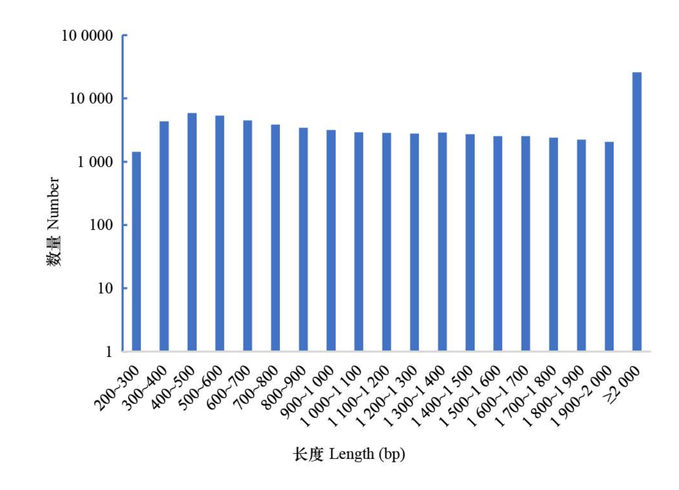


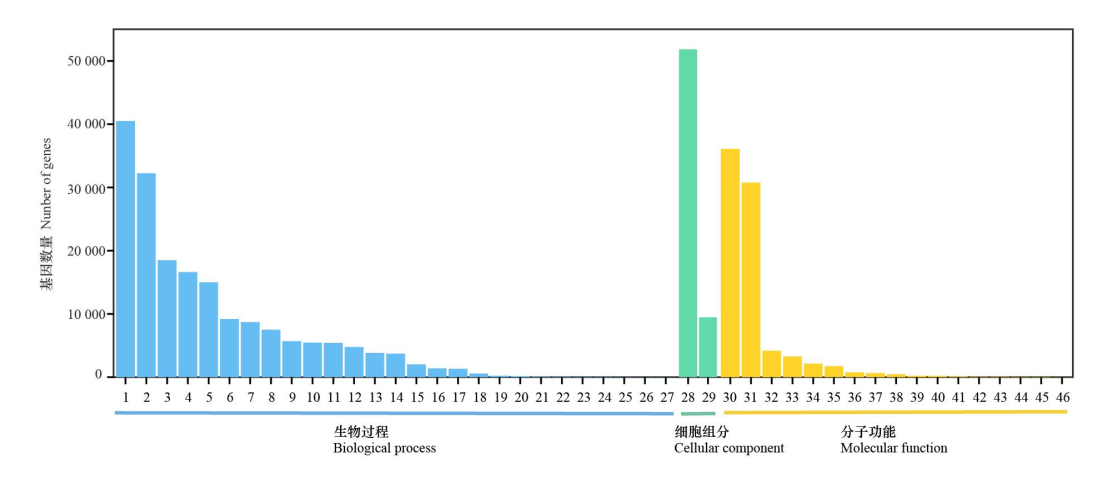
图 8 菘蓝转录组 Unigene 长度分布图

Fig. 8 Length distribution of Unigene in transcriptome of *Isatis indigotica*

2.4.2 Unigene 的功能注释

用 NR、TrEMBL、GO、Swiss-port、KOG、KEGG、Pfam 共 7 个数据库进行 Unigene 注释，分别成功注释 69 350（82.78%）、70 281（83.89%）、60 538（72.26%）、54 696（65.29%）、44 620（53.26%）、55 271（65.98%）、55 387（66.11%）个基因，至少在一个数据库注释成功的 Unigene 有 72 965 条（87.1%）。而样本间基因表达水平的相关性分析表明样本在一组中具有较高的一致性，确保了后面分析结果的可靠性。

在本研究中，共有 60 538 条 Unigene 得到了 GO 注释。总体分为 3 大类：分子功能（molecular function）中主要富集条目有催化活性（catalytic activity，30 758 条）和结合（binding，36 084 条）；细胞组分（cellular component）中细胞解剖实体（cellular anatomical entity）Unigene 数量最多，51 807 条；生物过程（biological process）中 Unigene 富集较多的类别有：细胞过程（cellular process，40 504 条）、应激适应（response to stimulus，18 474）、代谢过程（metabolic process，32 229 条）、生物调控（biological regulation，16 606 条）（图 9）。



1. 细胞过程（40 504）；**2**. 代谢过程（32 229）；**3**. 刺激响应（18 474）；**4**. 生物调节（16 606）；**5**. 生物过程的调节（14 988）；**6**. 发展过程（9 177）；**7**. 多细胞生物过程（8 714）；**8**. 定位（7 499）；**9**. 信号（5 694）；**10**. 复制（5 445）；**11**. 生殖过程（5 415）；**12**. 种间相互作用的生物过程（4 780）；**13**. 生物过程的负调控（3 834）；**14**. 积极调节生物过程（3 713）；**15**. 生长（2 032）；**16**. 免疫系统过程（1 382）；**17**. 多生物过程（1 319）；**18**. 节律过程（570）；**19**. 解毒（232）；**20**. 运动（162）；**21**. 生物黏附（100）；**22**. 种内相互作用的生物过程（64）；**23**. 氮利用率（46）；**24**. 碳利用率（35）；**25**. 色素沉积（14）；**26**. 硫利用率（1）；**27**. 碳水化合物利用率（1）；**28**. 细胞解剖实体（51 807）；**29**. 包含蛋白复合物（9 458）；**30**. 结合（36 084）；**31**. 催化活性（30 758）；**32**. 转运体活性（4 183）；**33**. 转录调节活性（3 266）；**34**. 结构分子活性（2 128）；**35**. 分子功能调节（1 747）；**36**. 分子转导活性（748）；**37**. 翻译调节活性（639）；**38**. 抗氧化活性（470）；**39**. 分子载体活性（213）；**40**. 分子衔接活性（209）；**41**. 蛋白折叠伴侣（121）；**42**. 蛋白质标签（76）；**43**. 一般起始因子活性（59）；**44**. 小分子传感器活性（42）；**45**. 营养库活动（40）；**46**. 毒素活性（5）。

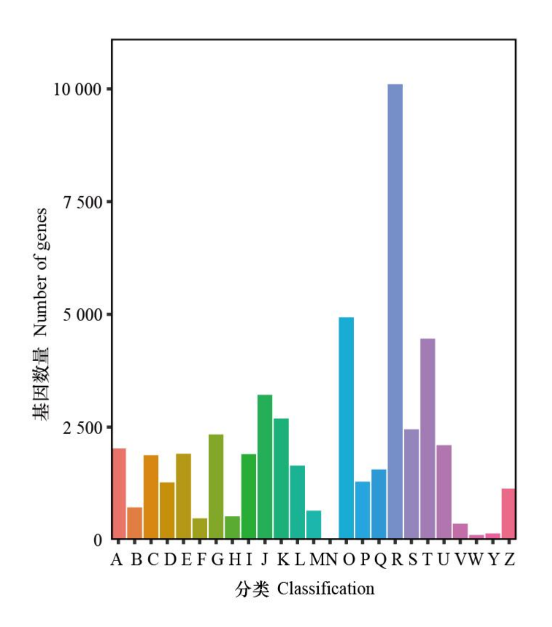
1. Cellular process (40 504); **2**. Metabolic process (32 229); **3**. Response to stimulus (18 474); **4**. Biological regulation (16 606); **5**. Regulation of biological process (14 988); **6**. Developmental process (9 177); **7**. Multicellular organismal process (8 714); **8**. Localization (7 499); **9**. Signaling (5 694); **10**. Reproduction (5 445); **11**. Reproductive process (5 415); **12**. Biological process involved in interspecies interaction between organisms (4 780); **13**. Negative regulation of biological process (3 834); **14**. Positive regulation of biological process (3 713); **15**. Growth (2 032); **16**. Immune system process (1 382); **17**. Multi-organism process (1 319); **18**. Rhythmic process (570); **19**. Detoxification (232); **20**. Locomotion (162); **21**. Biological adhesion (100); **22**. Biological process involved in intraspecies interaction between organisms (64); **23**. Nitrogen utilization (46); **24**. Carbon utilization (35); **25**. Pigmentation (14); **26**. Sulfur utilization (1); **27**. Carbohydrate utilization (1); **28**. Cellular anatomical entity (51 807); **29**. Protein-containing complex (9 458); **30**. Binding (36 084); **31**. Catalytic activity (30 758); **32**. Transporter activity (4 183); **33**. Transcription regulator activity (3 266); **34**. Structural molecule activity (2 128); **35**. Molecular function regulator (1 747); **36**. Molecular transducer activity (748); **37**. Translation regulator activity (639); **38**. Antioxidant activity (470); **39**. Molecular carrier activity (213); **40**. Molecular adaptor activity (209); **41**. Protein folding chaperone (121); **42**. Protein tag (76); **43**. General transcription initiation factor activity (59); **44**. Small molecule sensor activity (42); **45**. Nutrient reservoir activity (40); **46**. Toxin activity (5).

图 9 Unigene 的 GO 注释

Fig. 9 GO annotation distribution of Unigene

KOG 功能分类分析（图 10）可进一步了解菘蓝转录组的功能，本次共有 25 个不同功能且种类齐全类群，包含大多数的生命活动。其中 10 102 条被富集到一般功能预测，是 KOG

类群中 Unigene 数量最多的；排名第二的是翻译后修饰、蛋白质折叠和分子伴侣，4 932 条；注释到信号转导功能的也有 4 461 个基因，其他功能类群的基因丰度也不尽相同。



A. RNA 加工和修饰（2 023）；**B**. 染色体结构和活力（715）；**C**. 能量生成和转换（1 875）；**D**. 细胞周期控制、蛋白质折叠和分子伴侣（1 269）；**E**. 氨基酸运输和代谢（1 905）；**F**. 核苷酸运输和代谢（475）；**G**. 碳水化合物运输和代谢（2 335）；**H**. 辅酶运输和代谢（520）；**I**. 脂质运输和代谢（1 797）；**J**. 翻译、核糖体结构和生物合成（3 214）；**K**. 转录（2 686）；**L**. 重复、重组和修饰（1 643）；**M**. 细胞壁膜生物合成（642）；**N**. 细胞运动（24）；**O**. 翻译后修饰、蛋白质折叠和分子伴侣（4 932）；**P**. 矿脂运输和代谢（1 288）；**Q**. 次生代谢物合成、运输和代谢（1 558）；**R**. 一般功能预测（10 102）；**S**. 功能未知（2 450）；**T**. 信号传导（4 461）；**U**. 细胞内转运、分泌和小泡运输（2 096）；**V**. 防卫机制（357）；**W**. 胞外结构（104）；**Y**. 核结构（138）；**Z**. 细胞构架（1 135）。

A. RNA processing and modification (2 023); **B**. Chromatin structure and dynamics (715); **C**. Energy production and conversion (1 875); **D**. Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (1 269); **E**. Amino acid transport and metabolism (1 905); **F**. Nucleotide transport and metabolism (475); **G**. Carbohydrate transport and metabolism (2 335); **H**. Coenzyme transport and metabolism (520); **I**. Lipid transport and metabolism (1 897); **J**. Translation, ribosomal structure and biogenesis (3 214); **K**. Transcription (2 686); **L**. Replication, recombination and repair (1 643); **M**. Cell wall/membrane/envelope biogenesis (642); **N**. Cell motility (24); **O**. Posttranslational modification, protein turnover, chaperones (4 932); **P**. Inorganic ion transport and metabolism (1 288); **Q**. Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism (1 559); **R**. General function prediction only (10 102); **S**. Function unknown (2 450); **T**. Signal transduction mechanisms (4 461); **U**. Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport (2 096); **V**. Defense mechanisms (357); **W**. Extracellular structures (104); **Y**. Nuclear structure (138); **Z**. Cytoskeleton (1 135).

图 10　Unigene 的 KOG 分类

Fig. 10　KOG classification of Unigene

2.4.3 差异表达基因的筛选与功能分析

菘蓝接菌后 7、14、21 d 与同时间对照组比较分别有 2 439、256、6 437 个差异表达基因，结果表明菘蓝在根肿菌侵染后基因表达发生显著变化；其中 21 d 的 DEGs 最多，说明根肿菌侵染后期菘蓝基因表达发生剧烈变化；这 3 组共有 17 个差异表达基因，其中 9 个是上调的，8 个下调。接菌后 7、14、21 d 的实验组随着接菌时间的延长，差异基因数目在不断增加，其对根肿菌的响应更加剧烈（表 3）。

表 3　差异基因数量统计

Table 3　Differentially expressed genes in different samples

比对组 Group	总数 Total	上调 Up	下调 Down
BLG-CK2-vs-BLG-S2	2 439	1 298	1 141
BLG-CK3-vs-BLG-S3	256	116	95
BLG-CK4-vs-BLG-S4	6 437	5 838	599
BLG-S2-vs-BLG-S3	2 451	1 174	1 277
BLG-S2-vs-BLG-S4	8 752	6 494	2 256
BLG-S3-vs-BLG-S4	6 213	5 340	853

对 DEGs 进行 GO term 富集分析，根据细胞组成、分子功能和生物代谢对基因进行分类，共有 9 805 个 DEGs 被富集到这 3 个 GO 类别中。细胞组成过程中细胞解剖实体（cellular anatomical entity）的 DEGs 居第一位置；细胞过程（cellular process）、刺激反应（response to stimulus）和代谢过程（metabolic process）是 DEGs 在生物过程中富集较多的 3 个功能；结合（binding）和催化活性（atalytic activity）是 DEGs 在分子功能中的主要功能（表 4）。

表 4　差异基因数及功能注释

Table 4　Function annotation and gene dosage of the differentially expression genes

分类 Classification	功能注释 Function annotation	总数 Total	比对组 Contrast group					
			BLG-CK2-vs-BLG-S2	BLG-CK3-vs-BLG-S3	BLG-CK4-vs-BLG-S4	BLG-S2-vs-BLG-S3	BLG-S2-vs-BLG-S4	BLG-S3-vs-BLG-S4
细胞组成 Cellular component	细胞解剖实体 Cellular anatomical entity	16 973	1 871	181	3 821	1 845	5 584	3 671
	包含蛋白复合物 Protein-containing complex	3 488	168	18	1 042	131	1 137	992
生物过程 Biological process	细胞过程 Cellular process	13 688	1 415	140	3 244	1 338	4 463	3 088
	代谢过程 Metabolic process	10 692	1 107	105	2 561	1 034	3 482	2 403
	刺激反应 Response to stimulus	6 495	852	93	1 301	850	2 139	1 260
	生物调节 Biological regulation	5 621	693	63	1 169	694	1 856	1 146
	生物过程调控 Regulation of biological process	5 054	629	57	1 046	628	1 672	1 022

分子功能 Molecular function	结合 Binding	11 912	1 300	121	2 703	1 237	3 931	2 620
	催化活性 Atalytic activity	10 329	1 113	166	2 315	1 121	3 395	2 219
	转运蛋白活性 Transporter activity	1 348	163	23	265	172	463	262
	翻译调节蛋白活性 Transcription regulator activity	1 058	187	14	160	173	370	154

由于菘蓝中的主要活性成分为生物碱，氨基酸又是生物碱合成的基础，故主要分析氨基酸和生物碱相关的代谢通路。为了更清楚地了解所关注的生物碱类化合物与差异基因是否在通路上存在相关性，对 BLG-CK2-vs-BLG-S2、BLG-CK3-vs-BLG-S3、BLG-CK4-vs-BLG-S4 这 3 组差异基因进行 KEGG 富集分析，结果见表 5。结果发现 3 组共同富集在 11 个生物碱相关的代谢通路上，其中色氨酸代谢途径富集的差异基因数量较多。

表 5 生物碱合成相关通路 KEGG 富集

Table 5 KEGG enrichment in pathways related to alkaloid synthesis

Ko-ID	KEGG 通路名称 KEGG pathway name	差异表达基因数量 DEGs count		
		BLG-CK2-vs-BLG-S2	BLG-CK3-vs-BLG-S3	BLG-CK4-vs-BLG-S4
ko00950	异喹啉生物碱生物合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	5	2	8
ko00960	托烷，哌啶和吡啶生物碱生物合成 Tropane， piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	4	1	8
ko00360	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	5	1	8
ko00350	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	6	2	18
ko00380	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	6	2	25
ko00300	赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis	1	0	5
ko00330	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	14	1	24
ko00400	苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	10	1	18
ko00220	精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	11	1	18
ko00901	吲哚生物碱生物合成 Indole alkaloid biosynthesis	0	0	3
ko00996	各种生物碱生物合成 Biosynthesis of various alkaloids	0	0	1

2.5 生物碱合成途径相关基因挖掘

本研究重点对吲哚类生物碱合成途径及相关基因进行挖掘。结合图 11 分析：分支酸可在邻氨基苯甲酸合酶（Anthranilate synthase，AS）、色氨酸合成酶（Trytophan synthase asubunit，TSA）等酶的反应下合成吲哚；最后经过一系列反应合成色氨酸。色氨酸脱羧酶（L-tryptophan decarboxylase，TDC）是至关重要的酶，色氨酸可在其催化下生成色胺，并在吲哚-3-丙酮酸单加氧酶（indole-3-pyruvate monooxygenase，YUCCA）的催化作用下生成吲哚-3-乙酸酯；色胺也可在醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase，ALDH）的催化下合成 5-羟基吲哚-3-乙酸。

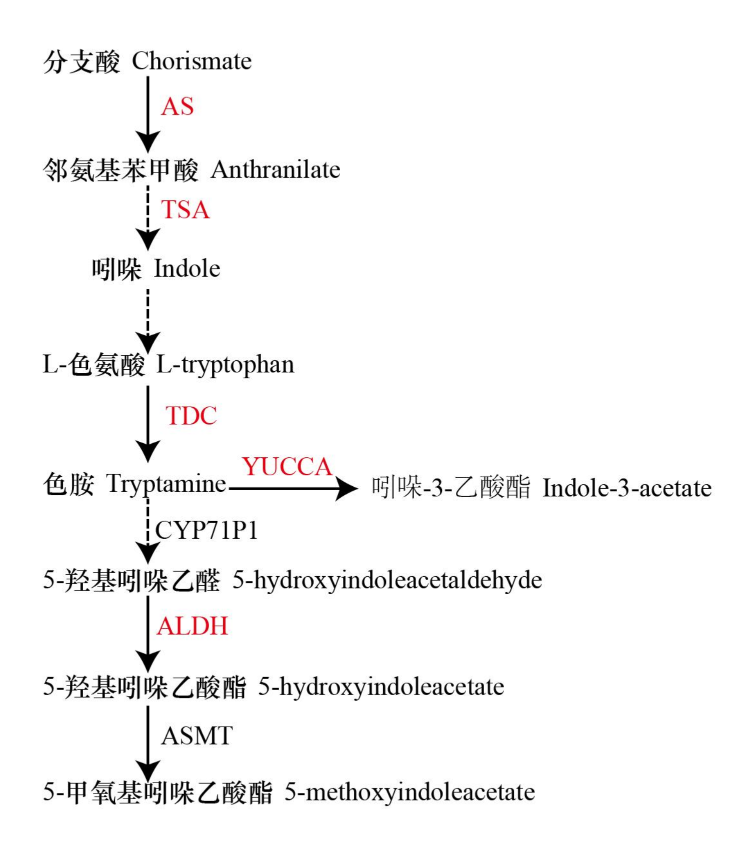
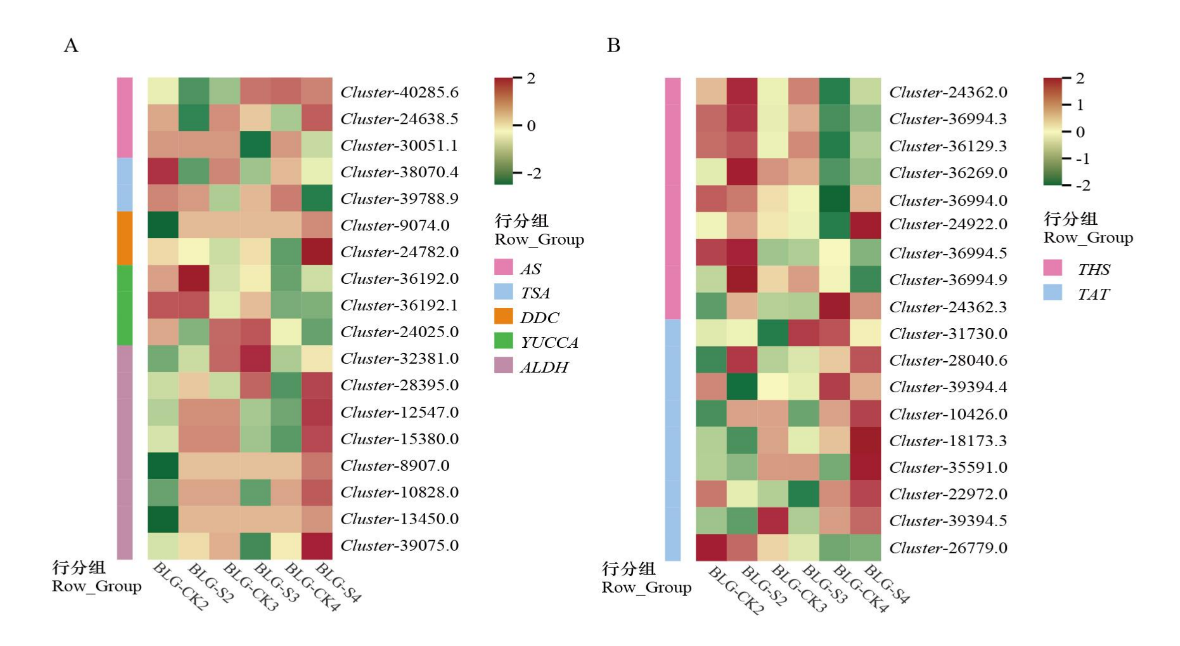


图 11　吲哚类生物碱生物合成途径

Fig. 11　Biosynthetic pathway of indole alkaloids

本研究从所有的 DEGs 中筛选到 18 个基因，分别编码吲哚生物碱合成途径的 5 种关键酶（AS、TSA、TDC、YUCCA、ALDH）（图 12：A），另外 18 个基因编码异喹啉类生物碱合成途径的 2 种关键酶：蒂巴因合成酶（thebaine synthase，THS）和酪氨酸氨基转移酶（tyrosine aminotransferase，TAT）（图 12：B）。与未接菌相比，接菌后 7、14、21 d 基因表达量均上调的一共有 9 个 DEGs：3 个编码 THS 的基因 *Cluster-24362.0*、*Cluster-36994.3*、*Cluster-36129.3*；2 个编码 TAT 的基因 *Cluster-31730.0*、*Cluster-28040.6*；2 个编码 YUCCA 的基因 *Cluster-36192.0*、*Cluster-36192.1*；以及 2 个编码 ALDH 的基因 *Cluster-32381.0*、*Cluster-28395.0*。



颜色代表基因在样品中的表达量 FPKM 标准化处理后的值。

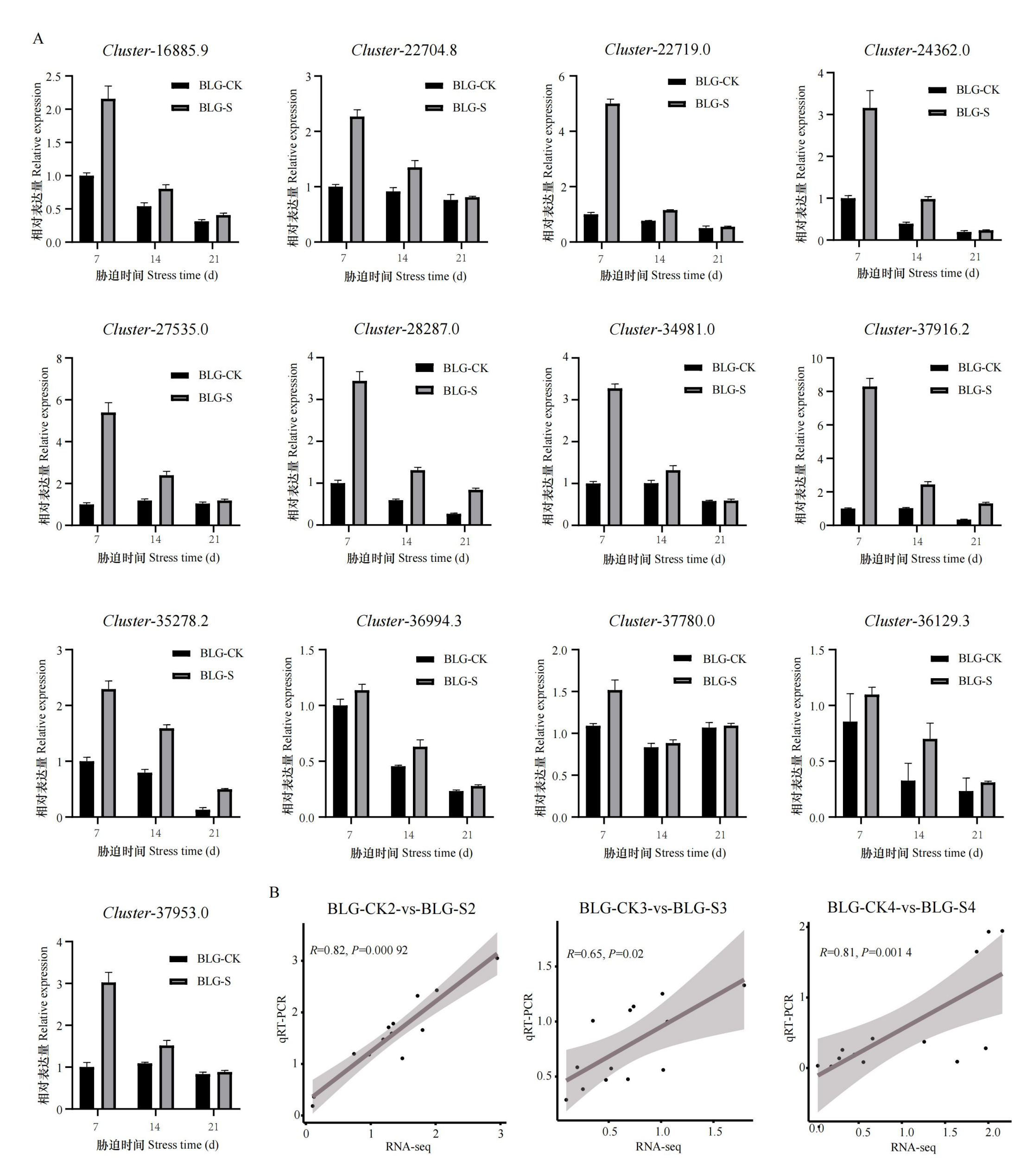
The color represents the gene expression in the sample after FPKM normalization.

图 12　生物碱合成相关基因表达量分析

Fig. 12　Analysis of gene expression associated to alkaloid synthesis

2.6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为了验证转录组数据的准确性，选择了 THS（*Cluster-24362.0*、*Cluster-36994.3*、*Cluster-36129.3*），AUX/IAA（*Cluster-34981.0*），GH3（*Cluster-16885.9*），SAUR（*Cluster-27535.0*），PYR/PYL（*Cluster-37780.0*），PP2C（*Cluster-35278.2*、*Cluster-37953.0*），ABF（*Cluster-37916.2*），B-ARR（*Cluster-22704.8*），TGA（*Cluster-22719.0*），AHK（*Cluster-28287.0*）进行 qRT-PCR 验证（图 13：A）。结果表明，上述酶基因在 BLG-CK2-vs-BLG-S2、BLG-CK3-vs-BLG-S3、BLG-CK4-vs-BLG-S4 中的表达趋势与 RNA-seq 结果一致（$P < 0.05$）（图 13：B），证明测序结果真实可靠。



A. 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 13 个差异表达基因的相对表达量；**B**. qRT-PCR 结果与 RNA-seq 数据之间的相关性。

A. The relative expression levels of 13 DEGs were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method; **B**. Correlation between qRT-PCR results and RNA-seq data.

图 13　差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 13　qRT-PCR validation of differentially expressed genes

3 讨论与结论

3.1 根肿菌侵染对菘蓝根部的影响

大量研究表明，感染根肿菌的植株其根部会不断膨大，直至变成大小形状不一的肿瘤，并且根部细胞会因为次级游动孢子的入侵而挤压变形、体积增大（Wei et al., 2021）。通常植株根部的肿大程度能反映其病情指数，根部细胞的变化情况能反映根肿菌的整个侵染过程。本研究连续 21 d 对根肿菌侵染菘蓝的过程进行实时动态观察，研究发现接菌后 0、7、14、21 d 菘蓝病情指数不断增加，分别为 0 级、1 级、3 级、5 级；组织学观察发现在接种后 7～14 d 根肿菌能快速侵染菘蓝根部细胞，为侵染高峰期，这与谢琪等（2022）的研究结果一致；

虽然 Wei 等（2021）的研究在根肿菌侵染时间上与本研究结果有所出入，考虑到这可能是所研究的寄主与侵染条件不同有关。此外，本研究采取病情形态分级结合组织学观察的方法，不仅有利于从整体全面的观察根肿菌侵染状况，为深入研究其他专性寄生病原菌做参照，而且为后期生化指标、转录组学和代谢组学取样时间提供了理论依据。

3.2 菘蓝响应根肿菌侵染生理生化指标的变化

根肿菌侵染下，菘蓝植株自身会做出一系列的应激反应，这与大多数学者研究结果一致（Wang et al., 2020）。本研究通过对接菌后 0、7、14、21 d 菘蓝的生理生化指标进行测定，结果发现，可溶性蛋白和丙二醛含量在根肿菌处理后 14 d 和 21 d 与未接菌相比含量显著增加，说明根肿菌侵染后期，植物受到的伤害程度更严重；根肿菌处理下菘蓝抗氧化酶 SOD、POD、CAT、PPO 活性变化趋势都是不断上升，说明菘蓝通过增加抗氧化酶活性来抵御根肿菌对植物的伤害；CAT 和 SOD 活性在接菌后 7 d 开始存在明显差异，但 POD 和 PPO 活性于 14 d 出现显著的差异，说明了 POD 和 PPO 发挥作用相比较于前 2 种防御酶 SOD、CAT 来说存在滞后性，这与郑翠明等（1999）的相关报道一致。

3.3 根肿菌侵染对菘蓝生物碱合成的影响

菘蓝作为我国的大宗药材，其吲哚类生物碱表告依春具有丰富的药理活性。长春花（*Catharanthus roseus*）（林颖等，2020）、罗芙木（*Rauvolfi serpentina*）（Dey et al., 2022）、钩藤（*Uncaria rhynchophylla*）（刘扬等，2021）等植物已经成为吲哚类生物碱合成研究的模式植物，菘蓝中吲哚生物碱代谢途径复杂多样，其中色氨酸代谢是吲哚类生物碱合成的前体途径（Huang et al., 2016）。目前，关于菘蓝中吲哚生物碱的合成机制、关键酶、多种基因功能的研究少见报道，并且有研究表明逆境胁迫能影响活性成分生物碱的积累（唐晓清等，2016；Jazayeri et al., 2022）。因此，有必要深入研究根肿菌胁迫下菘蓝吲哚类生物碱合成的分子机制。

代谢组学通过对接菌前后 7、14、21 d 菘蓝根次级代谢产物生物碱进行 OPLS-DA 分析，发现不管是接菌处理（接菌和不接菌）还是取样时间不同，代谢物都存在差异，且次级代谢物以吲哚类生物碱居多。差异代谢物 KEGG 富集分析表明各组多富集在氨基酸代谢途径尤其是色氨酸代谢，说明根肿菌侵染影响生物碱类化合物合成。进一步对 BLG-CK2-vs-BLG-S2、BLG-CK3-vs-BLG-S3、BLG-CK4-vs-BLG-S4 这 3 个组别的差异表达基因进行 KEGG 代谢通路富集分析，筛选出了 11 条与生物碱合成相关的代谢通路，其中色氨酸合成相关的差异基因数量较多。在此基础上转录加代谢联合分析共挖掘 18 个差异基因参与吲哚生物碱合成途径上游的 5 种关键酶 AS、TSA、TDC、YUCCA、ALDH，其中 YUCCA 和 ALDH 这 2 个关键酶的位置上存在差异表达基因上调的情况，且上调显著。研究发现与未接菌相比，接菌后 *YUCCA* 基因（C*luster-36192.0*、*Cluster-36192.1*）表达量均升高，这与 Cao 等（2019）的研究结果一致，都呈现出对生物胁迫的耐受性；但随着根肿菌侵染时间的不断增加，*YUCCA* 基因的表达量先升高再降低，这可能是植物自身对逆境胁迫做出的应激反应；*ALDH*（*Cluster-32381.0*、*Cluster-28395.0*）基因在接菌后相对比于未接菌其表达量上调，这是因为醛脱氢酶基因家族可以氧化有毒醛类物质，降低脂质过氧化，提高植物对逆境的耐受性（Du et al., 2022；Zhang et al., 2023）。由于缺乏根肿菌胁迫下菘蓝的全基因组，无法对吲哚类生物碱合成通路中的全部基因进行注释分析，故对下游完整的吲哚类生物碱合成通路研究造成困难。为此，后期可通过全基因测序和质谱分析进一步探索完整的吲哚生物碱合成通路。

另外，我们还发现了编码 2 种关键酶的 18 个差异表达基因均在异喹啉生物碱合成通路中被注释。目前 THS 酶的相关报道较少，但已经确定是病程相关蛋白 PR-10 超家族成员之一（Ozber et al., 2023）。本研究结果显示编码 THS 的 3 个差异基因（*Cluster-24362.0*、*Cluster-36994.3*、*Cluster-36129.3* ）在根肿菌侵染后其表达量都会升高，且在 qRT-PCR 验证中也具有相同的表达趋势，说明 THS 酶与抗根肿病密切相关，后期可着重分析 THS 酶的

功能。酪氨酸是异喹啉生物碱合成的前体，其中酪氨酸氨基转移酶（TAT）能催化酪氨酸合成 4-羟基苯丙酮酸，现已在拟南芥（Lopukhina et al., 2001）、丹参（Huang et al., 2008）、紫苏（吕晓玲等，2012）等植物成功分离克隆了 *TAT* 基因，并发现植物激素水杨酸和脱落酸处理后可在转录水平上诱导该基因的表达。本研究结果也发现编码 TAT 的基因 *Cluster-31730.0* 和 *Cluster-28040.6* 在根肿菌胁迫后表达量上升，说明 TAT 酶在胁迫中发挥重要作用。

qRT-PCR 实验结果表明，在根肿菌胁迫下，3 个时间点菘蓝实验组与对照组相比，*THS*（薛京，2020）、*AUX/IAA*（Jie et al., 2018）、*GH3*（Lu et al., 2022）、*SAUR*（Li et al., 2022）、*PYR/PYL*（Kim et al., 2020）、*PP2C*（Yu et al., 2019）、ABF（陈乃钰等，2021）、*B-ARR*（Falconieri et al., 2022）、*TGA*（Qi et al., 2022）、*AHK*（Cerbantez-Bueno et al., 2020）这些基因表达量都上调且随着根肿菌侵入时间的延长，同一基因其表达量不断降低，准确反映了根肿菌胁迫下大多数基因在菘蓝中的表达模式。

综上所述，对根肿菌侵染的菘蓝进行转录组测序和代谢组分析，极大的丰富了根肿菌胁迫下菘蓝的生物学信息，挖掘了参与吲哚类生物碱和异喹啉类生物碱合成的关键基因，探讨了这些关键基因在应对逆境胁迫下的表达规律，为后续深入研究这些基因的功能、解析根肿菌胁迫下菘蓝生物碱的积累机制奠定基础。

参考文献

陈乃钰，张国香，张力爽，等，2021. ABF 转录因子在植物响应非生物胁迫中的作用[J]. 植物遗传资源学报，22(4)：930-938. [CHEN NJ, ZHANG GX, ZHANG LS, et al., 2021. The role of ABF transcription factors in response to abiotic stress in plant[J]. J Plant Genet Resour, 22(4): 930-938.]

高俊凤，2006. 植物生理学试验指导[M]. 北京：高等教育出版社：142-218. [GAO JF, 2006. Guidance on plant physiology test[M]. Beijing: Higher Education Press: 142-218.]

郭珍，2018. 油菜抗根肿病品种主要生化指标及转录组分析[D]. 重庆：西南大学. [GUO Z, 2018. Main biochemical indexes and transcriptome analysis of rapeseed root disease resistance[D]. Chongqing: Southwest Univeristy.]

国家药典委员会，2020. 中国药典(第一部)[S]. 北京：中国医药科技出版社：214-215. [Chinese Pharmacopoeia Committee, 2020. Pharmacopoeia of people republic of China (Part 1) [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press: 214-215.]

林颖，王燕燕，于放，2020. 长春花茉莉酸-异亮氨酸合成酶 CrJAR1 生物信息学分析与原核表达[J]. 广西植物，40(8)：1181-1187. [LIN Y, WANG YY, YU F, 2020. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of jasmonic acid-isoleucine synthase CrJAR1 from *Catharanthus roseus*[J]. Guihaia, 40(8): 1181-1187.]

刘扬，张妮，罗俊，等，2021. 黔产钩藤茎、叶化学成分及抗肿瘤活性研究[J]. 广西植物，41(7)：1061-1069. [LIU Y, ZHANG N, LUO J, et al., 2021. Chemical constituents of stems and leaves from *Uncaria rhynchophylla* in Guizhou and their antitumor activities[J]. Guihaia, 41(7): 1061-1069.]

吕晓玲，郝磊，王芳，等，2012. 紫苏酪氨酸氨基转移酶基因片段的克隆及表达分析[J]. 中国农学通报，28(24)：207-212. [LU XL, HAO L, WANG F, et al., 2012. Molecular cloning and expression analysis of tyrosine aminotransferase gene fragment in *Perilla frutescen*[J]. Chin Agr Sci Bull, 28(24): 207-212.]

秦六月，2021. 大白菜响应根肿菌侵染的细胞学、生理生化及转录组学研究[D]. 郑州：郑州大学. [QIN LY, 2021. Cytological, physiological, biochemical and transcriptomics of Chinese cabbage in response to *Plasmodiophora brassicae* infection[D]. Zhengzhou:

Zhengzhou Univ.]
唐晓清，肖云华，赵雪玲，等，2016. 菘蓝根和叶的生物量与活性成分对氮素形态的响应[J]. 南京农业大学学报，39(1)：70-77. [TANG XQ, XIAO YH, ZHAO XL, et al., 2016. Response of biomass and active components in roots and leaves of *Isatis indigotica* Fort. to nitrogen forms[J]. J Nanjing Agr Univ, 39(1): 70-77.]
王公达，褚云霞，徐政，等，2022. 莲种胚在温度胁迫下的逆境生理研究[J]. 广西植物，42(12)：2128-2137. [WANG GD, CHU YX, XU Z, et al., 2022. Stress physiology of lotus embryo under temperature stress[J]. Guihaia, 42(12): 2128-2137.]
王文龙，2014. 新编植物生理学实验指导[M]. 北京：新华出版社：83-146. [WANG WL, 2014. New plant physiology experiment guide[M]. Beijing: Xinhua Publishing House: 83-146.]
谢琪，刘玉梅，韩风庆，等，2022. 青花菜、番茄与辣椒根肿菌侵染过程研究[J]. 中国蔬菜，398(4)：21-28. [XIE Q, LIU XM, HAN FQ, et al., 2022. Study on the infection process of *Plasmodiophora brassicae* in broccoli, tomato and capsicum[J]. Chin Veg, 398(4): 21-28.]
薛京，2020. 蒂巴因合成途径中关键酶 THS2 的表达纯化及晶体结构解析[D]. 天津：天津科技大学. [XUE J, 2020. Expression and purification and crystal structure resolution of THS 2, a key enzyme in the thebaine synthesis pathway[D]. Tianjin: Tianjin University Science and Technology]
杨华，任佐华，黄露，等，2014. 湖南省十字花科蔬菜栽培品种抗根肿病鉴定[J]. 湖南农业科学，(2)：5. [YANG H, REN ZH, HUANG L, et al., 2014. Identification of main cruciferous cultivars in Hunan province against clubroot[J]. Hunan Agric Sci, (2): 5.]
杨立国，王琪，苏都那布其，等，2021. 菘蓝属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学，38(16)：2039-2048. [YANG LG, WANG Q, SU DNB, et al., 2021. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Isatis*[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 38(16): 2039-2048.]
杨佩文，李家瑞，杨勤忠，等，2002. 十字花科蔬菜根肿病菌休眠孢子的分离与检测[J]. 云南农业大学学报，17(3)：301-302+306. [YANG PW, LI JR, YANG QZ, et al., 2002. Extracting and detecting *Plasmodiophora brassicae* resting spores[J]. J Yunnan Agric Univ, 17 (3): 301-302 + 306.]
郑翠明，滕冰，高凤兰，等，1999. 感染 SMV 后大豆种皮超氧物歧化酶过氧化物酶和多酚氧化酶的变化[J]. 中国农业科学，(1)：99-101. [ZHENG CM, TENG B, GAO FL, et al., 1999. Studies on the changes of superoxide dismutase, peroxidase and polyphenol oxidase in seed coat of soybeans after infected with soybean mosaic virus[J]. Sci Agric Sin, (1): 99-101.]
朱红芳，李晓锋，朱玉英，等，2015. 根肿病对不结球白菜的生长及生理生化物质和活性氧代谢的影响[J]. 西北植物学报，35(12)：2469-2476. [ZHU HF, LI XF, ZHU YY, et al., 2015. Effect of root swelling disease on the growth, physiological and biochemical substances and reactive oxygen species metabolism of Chinese cabbage[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 35(12): 2469-2476.]
CAO X, YANG H, SHANG C, et al., 2019. The roles of auxin biosynthesis *YUCCA* gene family in plants [J]. Int J Mol Sci, 20(24), 6343.
CERBANTEZ-BUENO VE, ZUIGA-MAYO VM, REYES-OLALDE JI, et al., 2020. Redundant and non-redundant functions of the AHK cytokinin receptors during gynoecium development[J]. Front Plant Sci, 11: 568277.
CHEN Q, LAN HY, PENG W, et al., 2021. *Isatis indigotica*: a review of phytochemistry, pharmacological activities and clinical applications[J]. J Pharm Pharmacol, 73(9): 1137-1150.

DEY A, ROY D, MOHTURE VM, et al., 2022. Biotechnological interventions and indole alkaloid production in *Rauvolfia serpentina*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 106(13-16): 4867-4883.

DU HM, LIU C, JIN XW, et al., 2022. Overexpression of the aldehyde dehydrogenase gene *ZmALDH* confers aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Int J Mol Sci, 23(1): 477.

FALCONIERI GS, BERTINI L, BIZZARRI E, et al., 2022. Plant defense: ARR11 response regulator as a potential player in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 13: 995178.

HUANG BB, YI B, DUAN YB, et al., 2008. Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway [J], Mol Biol Rep, 35: 601-612.

HUANG CP, LIAO JL, HUANG WJ, et al., 2022. Salicylic acid protects sweet potato seedlings from drought stress by mediating abscisic acid-related gene expression and enhancing the antioxidant defense system [J]. Int J Mol Sci, 23(23): 14819

HUANG, YU X, HE X, et al., 2016. The biosynthesis and genetic engineering of bioactive indole alkaloids in plants [J]. J Plant Biol, 59(3): 203-214.

JAZAYERI SM, POORALINAGHI M, TORRES-NAVARRETE Y, et al., 2022. Alkaloid production and response to natural adverse conditions in *Peganum harmala*: in silico transcriptome analyses [J]. Bio Technologia (Pozn), 103(4): 355-384.

JIE L, JING JZ, JIN ZZ, 2018. Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function [J]. Int J Mol Sci, 19(1): 259.

KIM J, KIM D, CHEON CI, et al., 2020. Modeling-based identification of a raptor-binding motif present in *Arabidopsis* ABA receptor PYL1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 533(4): 1303-1308.

LAN M, LI GL, HU JF, et al., 2019. iTRAQ-based quantitative analysis reveals proteomic changes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) in response to *Plasmodiophora brassicae* infection [J]. Sci Rep, 9(1): 12058-12058.

LI ZG, CHEN HW, LI QT, et al., 2022. Three SAUR proteins SAUR76, SAUR77 and SAUR78 promote plant growth in *Arabidopsis* [J]. Sci Rep, 12(1): 1994.

LOPUKHINA A, DETTENBERG M, WEILER EW, et al., 2001. Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 126: 1678-1687.

LU S, WANG P, NAI G, et al., 2022 Insight into VvGH3 genes evolutional relationship from monocotyledons and dicotyledons reveals that VvGH3-9 negatively regulates the drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol Biochem, 172: 70-86.

OZBER N, YU L, HAGEL JM, et al., 2023. Strong feedback inhibition of key enzymes in the morphine biosynthetic pathway from opium poppy detectable in engineered yeast [J]. ACS Chem Biol, 18(2): 419-430.

QI P, HUANG M, Hu X, et al., 2022. A ralstonia solanacearum effector targets TGA transcription factors to subvert salicylic acid signaling [J]. Plant Cell, 34(5): 1666-1683.

QI W, WANG F, Ma L, et al., 2020 Physiological and biochemical mechanisms and cytology of cold tolerance in Brassica napus [J]. Front Plant Sci, 11: 1241.

QU RJ, Miao YJ, Cui YJ, et al., 2019. Selection of reference genes for the quantitative real-time PCR normalization of gene expression in *Isatis indigotica* fortune [J]. BMC Mol Biol, 20(1): 9.

SINHA D, TIWARI AK, SINGH S, et al., 2008. Synthesis, characterization and biological activity of schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde [J]. Eur J Med Chen, 43(1): 160-165.

WANG D, SUN T, ZHAO S, et al., 2020. Physiological change alters endophytic bacteria community in clubroot of tumorous stem mustard infected by *Plasmodiophora brassicae* [J]. BMC Microbiol, 20(1): 244.

WEI X, ZHANG Y, ZHAO Y, et al., 2021. Root transcriptome and metabolome profiling reveal key phytohormone-related genes and pathways involved clubroot resistance in *Brassica rapa* L [J]. Front Plant Sci, 12: 759623.

WONG LW, GOH C, TAN J, 2022. A systemic review for ethnopharmacological studies on *Isatis indigotica* Fortune: bioactive compounds and their therapeutic insights [J]. Amer J Chin Med, 50(1): 161-207.

YU XF, HAN JP, WANG EF, et al., 2019. Genome-wide identification and homoeologous expression analysis of *PP2C* genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Front Genet, 10: 561.

ZHANG XM, ZHONG JW, CAO LA, et al., 2023. Genome-wide characterization of aldehyde dehydrogenase gene family members in groundnut (*Arachis hypogaea*) and the analysis under saline-alkali stress [J]. Front Plant Sci, 14: 1097001.